

Aus der Universitätskinderklinik Zürich

(Direktor: Prof. G. Fanconi)

und aus dem phys.-chem. Institut der Universität Zürich

(Direktor: Prof. F. Leuthardt)

EINFLUSS DER ZERSETZUNG DES URINS AUF DAS PAPIERCHROMATOGRAPHISCHE FLECKENMUSTER DER AMINOSÄUREN

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der Medizinischen
Fakultät der Universität Zürich.

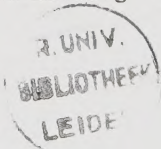
Vorgelegt von: Karl Johan Kristiansen von Oslo, Norwegen.

Genehmigt auf Antrag von Prof. Dr. G. Fanconi
und Prof. Dr. F. Leuthardt.

Zürich 1953.

INHALTSVERZEICHNIS

I Fragestellung	S. 3
II Übersicht	« 3
III Beschreibung der Methode	« 4
IV Das experimentelle Vorgehen	« 6
Serie I	« 6
Serie II	« 13
V Diskussion	« 20
VI Zusammenfassung	« 20



I. Fragestellung.

Die vorliegende Arbeit umfasst eine Untersuchung mittels Papierchromatographie über das Verhalten von 12 Aminosäuren bei zersetzten Urinen.

Es ist von grosser praktischen Bedeutung festzustellen welche Veränderungen die Chromatogramme bei der Zersetzung des Urins erfahren.

Wie stabil ist das Fleckenmuster? — Gehen die Flecken verloren? — Werden sich durch die Bakterienwirkung neue Flecken bilden?

Um diese Fragen näher abzuklären ist die Arbeit zu stande gekommen. Sie ist im chemischen Labor der Universitäts-Kinderklinik Zürich ausgeführt worden.

II. Übersicht.

Bei jeder chromatographischen Analyse sind zwei Phasen vorhanden: eine feste unbewegliche und eine flüssige bewegliche. Ein Stoff, den von der festen Phase adsorbiert wird oder sich zwischen der flüssigen und der festen Phase gemäss einem bestimmten Verteilungskoeffizienten verteilt, wandert beim Durchlaufen des Lösungsmittels langsam der Säule entlang. Die Wanderungsgeschwindigkeit hängt dabei von der Affinität des Stoffs zum Adsorbtionsmittel, resp. vom Verteilungskoeffizienten ab.

Bei der Papierchromatographie wird die feste Phase durch den Papierstreifen gebildet. Es wird vielfach angenommen, dass sich die Stoffe zwischen der Papierfaser und dem Lösungsmittel gemäss ihrer Löslichkeit in den beiden verteilen, doch spielen wahrscheinlich auch Adsorbtionserscheinungen an der Oberfläche der Phase eine wichtige Rolle.

Die Papierchromatographie ist zuerst von *Gordon und Mitarbeitern* verwendet worden, um die Aminosäuren in Proteinhydrolysaten und anderen Aminosäuremischungen zu bestimmen (1943). *Consden und Mitarbeiter* gaben 1944 eine eingehende Beschreibung der Methode. (*Consden, Gordon und Martin 1944*).

Später berichtete *Dent* über die Verwendung der Papierchromatographie zur Untersuchung von biologischen Flüssigkeiten, so u. a. von Urin in Fällen des *Fanconi-Debré-de Toni Syndroms* und bei Lebercirrhose, sowie zur Untersuchung von Blutplasma (*Dent 1946*).

Im folgenden Jahr gab derselbe Autor einen Bericht über das Verhalten von 60 Aminosäuren und verwandten Substanzen. und veröffentlichte in dieser Arbeit eine Fleckenkarte («Map of the Spots»), wo diese Substanzen an den charakteristischen Plätzen im Chromatogramm eingezeichnet waren (*Dent 1947*).

Im Jahre 1949 beschrieben *Hermann, Bickel und Fanconi* eingehend die Papierchromatographie, ihre Reagenzien und Apparate und zeigten ihre grosse Anwendung in einem klinischen Labor. So ist im Kinderspital Zürich die Papierchromatographie seit 1948 zu diagnostischen Zwecken mit Erfolg verwendet worden.

In der 1949 von *Fanconi und Bickel* veröffentlichten Arbeit wurden zwei Fälle von nephrotisch-glukosurischem Zwergwuchs (*Fanconi-Debré-de Toni-Syndrom*) beschrieben, wobei eine chronische Aminoacidurie chromatographisch nachgewiesen werden konnte.

Mit derselben Methode wurde gleichzeitig eine akute Aminoacidurie, bei einem Fall von schwerer Lebercirrhose, ante mortem, festgestellt. (*Fanconi und Bickel 1949*).

In aller letzter Zeit hat *Ross* Aminosäuren in Faeces beim Säugling chromatographisch bestimmt. (*C. A. C. Ross 1951*).

So ist die Papierchromatographie zu einer neuen Methode in der medizinischen Diagnostik geworden und hat in kurzer Zeit grosse Bedeutung erlangt.

III. Kurze Beschreibung der Methode.

Das eindimensionale Chromatogramm: Einige cm. innerhalb des Randes eines Whatman-Filterpapiers Nr. 1 oder 4 werden 35 mm.³ von dem zu untersuchenden Urin aufpipettiert und mittels Heissluft getrocknet. Es können im gleichen Chromatogramm mehrere Urine (oder andere Flüssigkeiten) untersucht werden. In diesem Fall werden die betreffenden Portionen am Rande des Filterpapiers in gleichen Abständen aufpipettiert. Wegen der grossen Empfindlichkeit der Ninhydrinreaktion darf das Papier nicht mit blossen Händen berührt werden. *Consden* empfiehlt den Gebrauch von Handschuhen oder Instrumenten (*Consden, Gordon, Martin 1944*).

Der Rand des Papiers wird nun in Phenol getaucht. Das geschieht in einem dazu eingerichteten Kasten, der mit einer Küvette versehen ist. Das Papier wird in der Küvette, die eine bestimmte Menge Phenol enthält mittels eines Glasstabes befestigt. — Das Lösungsmittel bringt die Aminosäuren an die für sie am Filterpapier charakteristischen Stellen. Je nach der Sorte bleibt das Papier 14 bis 24 Stunden im Kasten. Nachdem das Chromatogramm während 8 Stunden im Trockenschrank bei einer Temperatur von 40 Gr. C aufbewahrt worden ist, wird es entwickelt, was durch Besprayen von 1 0/00 Ninhydrin-Butanollösung geschieht. Spezifisch gefärbte Flecken zeigen sich nach 1 Stunde im Trockenschrank bei derselben Temperatur. Die Flecken liegen nun nacheinander in einer Linie.

Das 2-dimensionale Chromatogramm:

Es gibt kein Lösungsmittel, dass die Trennung aller Aminosäuren gestattet. Um die durch Phenol nicht trennbare Aminosäuren auch noch aufzuteilen, kommt das zweidimensionale Chromatogramm zur Anwendung. Man geht in derselben Weise vor wie oben beschrieben. Das Filterpapier bleibt 14 bis 24 Stunden im Phenolkasten und wird im Trockenschrank getrocknet. Nachher wird das Papier um 90 Grad gedreht, und der entsprechende Rand in das Lösungsmittel Kollidin (2, 4, 6-Trimethylpyridin) getaucht. Die Aminosäuren, die eindimensional längs einer Linie ausgezogen wurden, werden nun durch das Kollidin mitgeführt. Nach 14 bis 24 Stunden im Kollidinkasten wird das Papier getrocknet und mit Ninhydrin entwickelt.

Um die Wanderungsgeschwindigkeit eines Stoffes auszudrücken, benützt man den sogenannten Rf-Wert, der von *Consden* eingeführt wurde. Der Rf-Wert ist definiert als das Verhältnis der von dem Flecken zurückgelegten Strecke zum Abstand der Lösungsmittelfront vom Ausgangspunkt. Der Rf-Wert ist unabhängig von der Dauer des Versuches.

Endlich soll kurz erwähnt werden, dass sich die schwefelhaltigen Aminosäuren Cystin und Methionin chromatographisch nicht oder sehr schwer darstellen lassen. Durch Oxydation mit Wasserstoffperoxyd geht das Cystin in Cysteinsäure, das Methionin in Methioninsulfon über, die beide gut zur Darstellung kommen. Im Reagenzglas wird Wasserstoffperoxyd zu Urin im Verhältnis 1 : 2,5 zugesetzt. Nachdem das Gemisch 2—3 Stunden bei Zimmertemperatur aufbewahrt worden ist, wird es auf das Filterpapier aufpipettiert.

IV. Das experimentelle Vorgehen.

Als Ausgangspunkt für die Untersuchungen musste man sich einen Urin verschaffen, der die zu untersuchenden Aminosäuren enthielt. Löst man die betreffenden Aminosäuren in gleicher Menge in einen frischen Urin und in einer Konzentration, die derjenigen eines Urins bei der Aminoacidurie entspricht, bekommt man ein Chromatogramm, das eindeutig nur die charakteristische Flecken gibt, ohne Störungen irgend welcher Art (z. B. Polypeptide, zweifelhafte oder nicht identifizierbare Substanzen). Erst dann kann man eventuelle Veränderungen der Chromatogramme richtig beurteilen.

Die vorliegende Arbeit umfasst die Untersuchung über das Verhalten von 12 Aminosäuren. Wir teilten die Untersuchung in 2 Serien, 6 Aminosäuren in jeder Serie. Jedesmal liessen wir die Urine 20 Tage zersetzen bei Zimmertemperatur und bei 37 Grad C. Es wurden im ganzen um 110 Chromatogramme gemacht, in der ersten Serie ein und zweidimensional, in der zweiten Serie nur zweidimensional.

Von jeder Aminosäure, die untersucht werden musste, wurde eine Menge von 50 mg zu 100 cc. frischem, normalen Urin zugesetzt. (Das Verhältnis entspricht der Konzentration des Urins bei der Aminoacidurie). Nachher verteilte man den Urin in 3 Portionen.

- 1) Die erste wurde im Zimmer bei gewöhnlicher Temperatur, die im Sommer schwankte zwischen 20—25 Gr. C, aufbewahrt.
- 2) Die zweite stellte man in den Brutschrank bei einer Temperatur von 37 Gr. C.
- 3) Die dritte Portion wurde im Eisschrank aufbewahrt und mit Thymol konserviert.

Die Chromatogramme wurden täglich oder jeden zweiten Tag von den zwei ersteren Harnportionen ausgeführt. Die pH-Werte wurden ständig kontrolliert. Zu diesem Zweck wurde Indikatorpapier verwendet, Fehlerquelle $\pm 0,2$. Der höchste basische Wert, den wir mit dieser Methode messen konnten, war pH-8,1.

Die wiedergegebenen Photos, die alle von dem Photographen des Kinderspitals Zürich aufgenommen wurden, zeigen eine Auswahl der Chromatogramme.

Serie I.

Zu 100 cc. frischer Normalurin wurden 50 mg der folgenden 6 Aminosäuren gesetzt:

Serin	Threonin	Tryptophan
Glykokoll	Alanin	Leucin.

Der Urin war klar, gelb. Sp.G.: 1028. pH: 5,5.

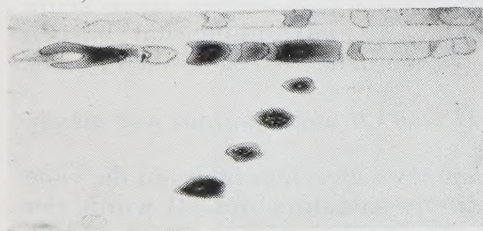
Da der Rf-Wert für Kollidin erheblich schwankt und in der Literatur sehr verschieden ist, haben wir nur den Rf-Wert für Phenol in den Chromatogrammen eingezeichnet und angegeben. (*Dent* fand (1946) einen Unterschied von 25 % im Rf-Wert für Kollidin. *Hermann, Bickel und Fanconi* (1949), sowie *Fanconi und Bickel* (1949) erhielten Rf-Werte, die bedeutend kleiner waren als diejenige Dents.)

Es wurden in dieser Serie eindimensionale sowie zweidimensionale Chromatogramme ausgeführt. Ausser den Urinen mit den gelösten Aminosäuren liessen wir in den eindimensionalen Chromatogrammen je eine Portion von demselben Urin ohne Zusatz mitlaufen (in gleicher Weise bei Zimmertemperatur und bei 37 Gr. C aufbewahrt.) Dies zur Feststellung von eventuellen Veränderungen und zum Vergleich. Endlich wurden im eindimensionalen Chromatogramm die entsprechenden Testamino-säuren mitgenommen.

a) Die Chromatogramme des Urins bei Zimmertemperatur.

Zuerst werden die Untersuchungen des Urins bei Zimmertemperatur beschrieben. In dem eindimensionalen Chromatogramm im Abb. 1 vergleicht man den Nativurin, der normalerweise ganz kleine Mengen Glykokoll und Alanin aufweist, mit dem Urin, worin die Aminosäuren gelöst wurden. Die typischen Flecken kommen gut zur Darstellung, obwohl sie im Vergleich zu den entsprechenden Testamino-säuren teilweise ineinander übergehen und verstrichen sind. Die Aminosäuren beeinflussen sich gegenseitig, zum Teil haben die Salze des Urins Einfluss (*Consden, Gordon und Martin*).

Abb. 2 zeigt das Chromatogramm des Urins mit den Aminosäuren nach der zweidimensionalen Methode. Die Flecken treten auf in ihren typischen Farben, die Rf-Werte für Phenol stimmen mit denjenigen der Literatur gut überein. Fleck Nr. II ist nach *Dent* Taurin, das normal im Urin vorkommt (*Dent* 1947).



Nativurin
 Urin mit 6 Am. S.
 Serin
 Glykokoll
 Threonin
 Alanin
 Leucin

Ab. 1. 1-dim. Phenol-Chromatogramm. Frisch.

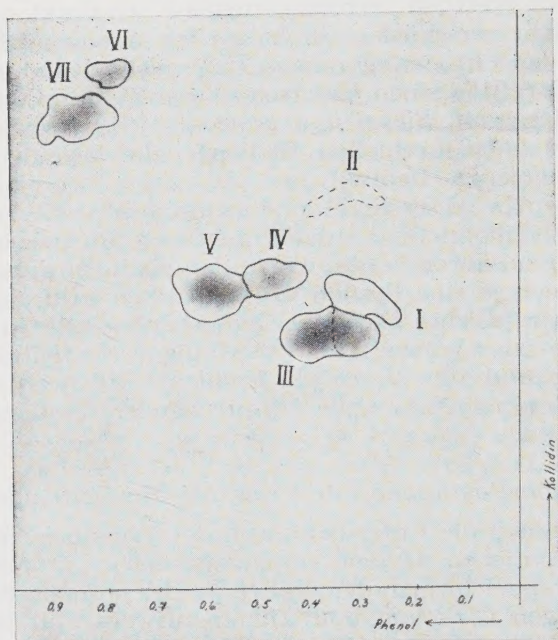


Abb. 2. 2-dim. Phenol-Kollidin-Chromatogramm von Urin mit 6 zugesetzten Aminosäuren. Frisch.

Fleck	Rf Phenol	Farbe	Aminosäure
I	0,35	braunviolett	Serin
II	0,38	violett	Taurin
III	0,41	orange-violett	Glykokoll
IV	0,50	violett	Threonin
V	0,62	violett	Alanin
VI	0,77	rotbraun	Tryptophan
VII	0,85	violett	Leucin

Die Chromatogramme der folgenden Tage zeigten lange keine Veränderung. Die Rf-Werte und die Farbenintensität blieben konstant. Auch die pH-Werte waren nach 10 Tagen noch immer unverändert, pH: 5,5.

Nach 13 Tagen war pH: 6,0. Das Chromatogramm war gleich, was aus Abb. 3 ersichtlich ist.

Die folgenden Chromatogramme zeigten nun langsam die erste Veränderung. Gleichmässig mit der Zunahme des pH wurde der Threoninfleck schwächer. Am 19. Tag, bei pH: 7,5, war der Fleck nicht mehr nachweisbar. Siehe Abb. 4 Die übrigen Aminosäuren

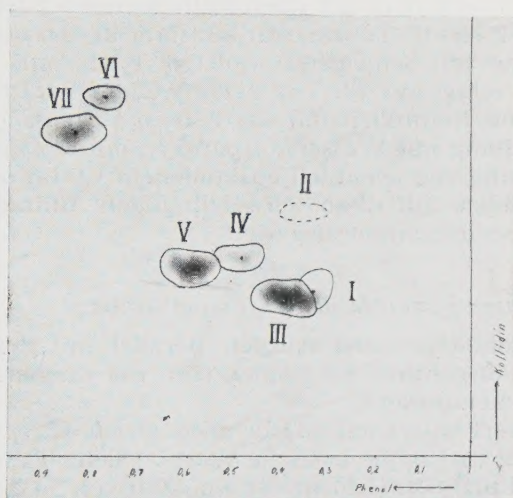


Abb. 3. Nach 13 Tagen bei Zim. tp.

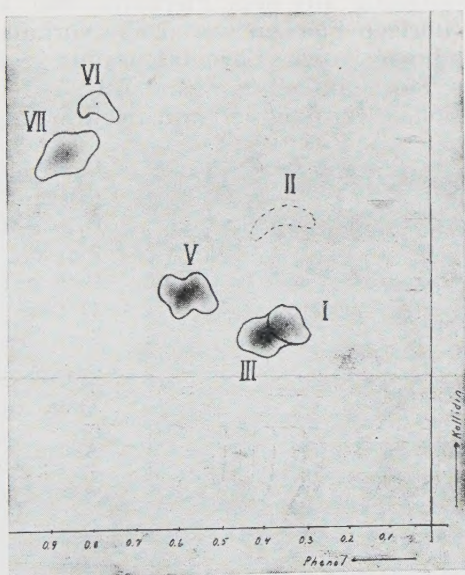


Abb. 4. Nach 19 Tagen bei Zim.tp.

waren alle unverändert mit übereinstimmenden Rf-Werten und Farben. Fleck Nr. II, Taurin, trat konstant in den meisten Chromatogrammen mit schwacher, violetter Farbe auf. Das Chromatogramm zeigte am 20. Tag keine weitere Veränderung.

Wir führten Kontrollen mit oxydiertem Urin nach der speziellen Behandlung mit Wasserstoffperoxyd durch (s. oben). Dies zur Feststellung von eventuell entstandenem Cystin oder Methionin. Im Hinblick auf diese schwefelhaltigen Aminosäuren blieben die Chromatogramme negativ.

b) Die Chromatogramme des Urins bei 37 Gr. C.

Diese Chromatogramme wurden parallel mit den oben beschriebenen ausgeführt. Sie zeigten eine viel raschere Veränderung des Fleckenmusters.

Der pH-Wert war nach 1 Tag noch gleich (5,5), stieg dann relativ schnell und zeigte basische Werte. (Siehe Tabell 1). Nach 3 Tagen war pH: 6,0. (Entspricht eine Zeit von 13 Tagen bei im Zimmer aufbewahrten Urin). Eine Abschwächung des Threonin-Fleckes war deutlich sichtbar. Nach 6 Tagen war Threonin nur noch als ganz schwacher Fleck darstellbar (pH: 6,4), nach 8 Tagen aber vollständig aus dem Fleckenmuster verschwunden (pH: 6,8). Die übrigen Flecken waren alle vorhanden. Das entsprechende eindimensionale Chromatogramm zeigte ebenfalls das Fehlen des Threoninfleckes, siehe Abb. 5. — Abb. 6 zeigt das zweidimensionale Chromatogramm nach 8 Tagen bei 37 Gr.

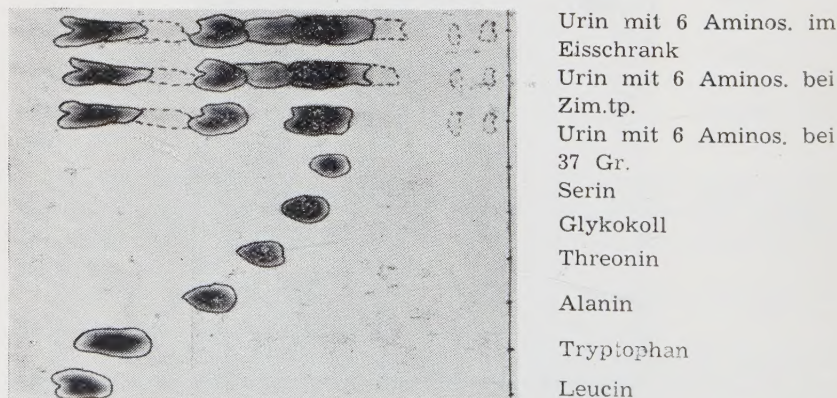


Abb. 5. 1-dim. Phenol-Chromatogramm nach 8 Tagen.

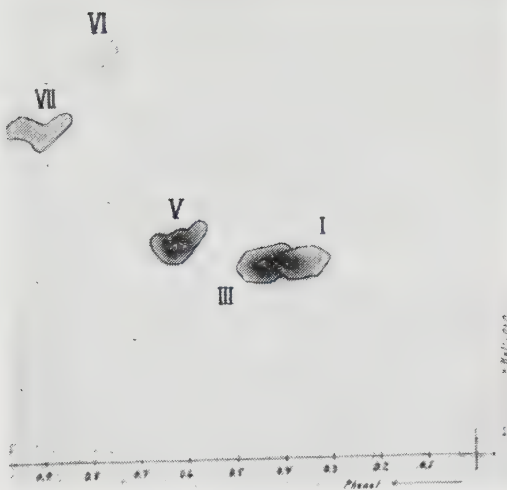


Abb. 6. Nach 8 Tagen bei 37 Gr.

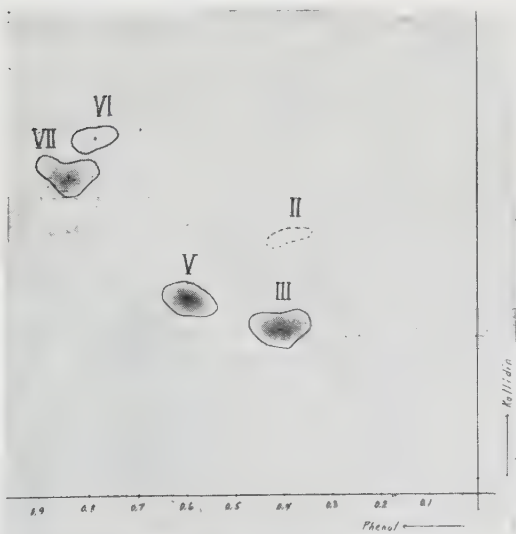


Abb. 7. Nach 14 Tagen bei 37 Gr.

Tabell 1. Schematische Darstellung der pH-Werte und der Veränderung des Fleckenmusters bei den bei Zimmertemperatur und bei 37 Gr. C. aufbewahrten Urinportionen. Serie I.

Tage		0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20
pH	Kühlschr.	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5
	Zim.temp.	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5.8	6.0	6.0	6.2	6.9	8.1
	37°	5.5	5.7	6.0	6.4	6.8	7.0	7.2	7.6	7.9	8.1	8.1
Serin	Ztp.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	37°	+	+	+	+	+	+	(+)	÷	÷	÷	÷
Glykokoll	Ztp.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	37°	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Threonin	Ztp.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	(+)	÷
	37°	+	+	(+)	(+)	÷	÷	÷	÷	÷	÷	÷
Alanin	Ztp.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	37°	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Thryptophan	Ztp.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	37°	+	+	+	+	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Leucin	Ztp.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	37°	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+ = Fleck gut nachweisbar. (+) = Fleck abgeschwächt.

÷ = Fleck verschwunden.

Ausser dem Fehlen des Theroninfleckes, ist zu bemerken dass Tryptophan, Fleck Nr. VI, in seiner Farbenintensität etwas abgenommen hat.

Die Chromatogramme der nächsten Tage zeigten dasselbe Bild. Threonin trat nie mehr auf.

Nach 14 Tagen war pH: bis 7,6 gestiegen. Gleichzeitig verschwand der Serinfleck, Nr. I. Das Chromatogramm ist in Abb. 7 wiedergeben. Die übrigen vier Aminosäuren blieben alle noch deutlich bestehen. Fleck Nr. VI, Tryptophan, war bedeutend abgeschwächt. Doch war die rotbraune Farbe des Fleckes erkennbar. Fleck Nr. VII, Leucin, war nachweisbar und in den nächsten Chromatogrammen vorhanden.

Nach 20 Tagen zeigte das Chromatogramm folgende 4 Aminosäuren: Glykokoll, Alanin, Tryptophan und Leucin, die als

ziemlich stabil bezeichnet werden dürfen. Nun war der Urin in Fäulnis übergegangen, und die Versuche wurden abgeschlossen. — Schwefelhaltige Aminosäuren waren nicht vorhanden.

Der Vergleich der Chromatogramme von Serie I ergibt folgender Unterschied: Nach 8 Tagen verschwand aus dem Urin bei 37 Gr. Threonin, während der Fleck bei dem Urin im Zimmer unverändert auftrat. Erst nach 19 Tagen war Threonin bei diesem Urin nicht mehr nachweisbar, während schon nach 14 Tagen bei 37 Gr. sowohl Threonin wie Serin verloren gegangen waren. Die Entwicklung ist also in beiden Urinportionen die gleiche, beim Urin im Brutschrank beschleunigt.

Die Chromatogramme des konservierten Urins im Eisschrank blieben durch die Versuchsdauer ohne Veränderung.

Von den Untersuchungen der Nativurine in den Eindimensionalen Chromatogrammen ist nur zu sagen, dass ersichtliche Veränderungen nicht feststellbar waren. — Hingegen war auffallend, dass diese Urinportionen viel rascher zersetzt wurden als dieselben Urine mit den gelösten Aminosäuren. Das war der Fall sowohl bei den Portionen im Zimmer als auch bei denjenigen im Brutschrank.

Die *mikroskopische Sedimentuntersuchung* zeigte Harnsäurekristalle, Tripelphosphat, sowie Oxalate. Die Sedimente der zwei zersetzten Urinportionen hatten das gleiche Aussehen.

Die *bakteriologische Untersuchung* ergab gramnegative plumpe Stäbchen, Colibacillen.

Serie II.

Analog wie in der ersten Serie wurden in 100 cc. frischen Normalurin 50 mg von jeder der folgenden Aminosäuren gelöst:

Asparaginsäure	Histidin	Arginin
Glutaminsäure	Tyrosin	Phenylalanin.

Wieder wurde der Urin in 3 Portionen geteilt, die 1) bei Zimmertemperatur, 2) bei 37 Grad C und 3) im Eisschrank mit Thymol konserviert, aufbewahrt wurden. Der Urin war klar, gelb. Sp. G.: 1022. pH: 5,5.

Diese Serie wurde nur mit Hilfe der zweidimensionalen Methode durchgeführt. Flecken der oben genannten Aminosäuren lassen sich eindimensional nicht gut trennen. (Besonders Histidin und Tyrosin, Arginin und Phenylalanin.)

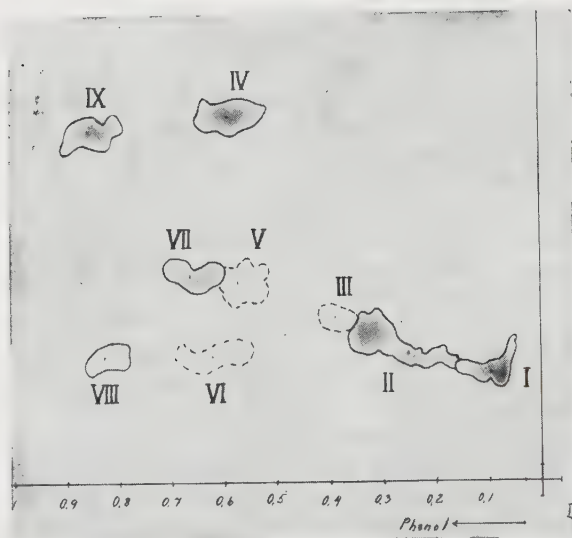


Abb. 8. 2-dim. Phenol-Kollidin-Chromatogramm von Urin mit 6 zugesetzten Aminosäuren. Frisch. (Serie II).

Fleck	Rf Phenol	Farbe	Aminosäure
I	0.14	blau	Asparaginsäure
II	0.28	violett	Glutaminsäure
III	0.41	schw. orangeviol.	Glykokoll
IV	0.58	violett	Tyrosin
V	0.60	schw. violett	Alanin
VI	0.62	schw. violett	Glutamin
VII	0.67	violett	Histidin
VIII	0.84	violett	Arginin
IX	0.86	blauviol.	Phenylalanin

Die Untersuchung erstreckte sich wieder über 20 Tage. Die Chromatogramme der 3 bei verschiedener Temperatur aufbewahrten Urine wurden täglich oder jeden zweiten Tag parallel ausgeführt. Die Abbildungen zeigen einen Auswahl der Chromatogramme und geben ein typisches Bild der Ergebnisse.

a) *Die Chromatogramme des Urins bei Zimmertemperatur.*

Das erste Chromatogramm ist in der Abb. 8 wiedergegeben. — Die 6 zugesetzten Aminosäuren treten deutlich mit charakteristischen Farben hervor. Die Rf-Werte stimmen für die meisten

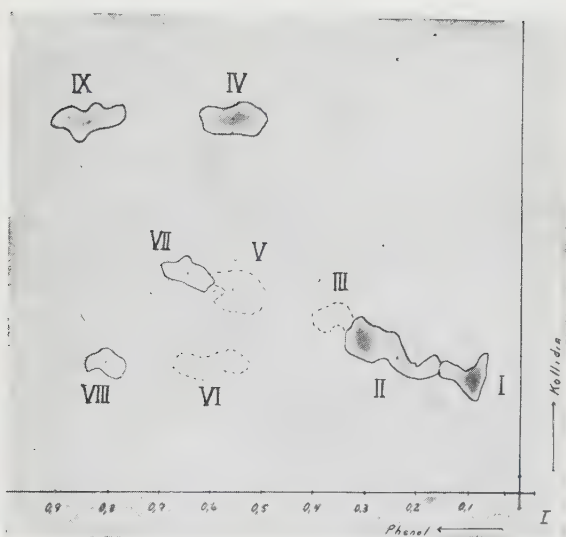


Abb. 9. Nach 7 Tagen bei Zimmertp.

relativ gut mit den Angaben der Literatur überein. Es können aber auch bei der Verwendung von Phenol Schwankungen auftreten. Sie sind zurückzuführen auf Temperaturunterschiede und Beschaffenheit des Phenols. (Dent 1946).

Die übrigen 3 Flecken (gestrichelt) sind Substanzen, die in dem frischen Urin selbst vorhanden sind. So sind Fleck Nr. III (Glykokoll) und Nr. V (Alanin) in geringer Menge nachweisbar. Die Flecken waren schwach, die Farbe aber noch deutlich. Die Rf-Werte sind typisch. Die beiden Aminosäuren kommen im Urin im allgemeinen vor. — Fleck Nr. VI war sehr schwach mit violetter Farbe. Der Fleck war von Anfang an vorhanden und verschwand später. Es muss ebenfalls eine Substanz des frischen Urins selbst sein. — Nach Dent ist ein Fleck *dieser Lokalisation bei normalem* Urin Glutamin. (In pathologischen Urinen würden noch andere Substanzen in Betracht kommen. Dent 1947).

Wie in der ersten Serie zeigte es sich auch hier, dass die Chromatogramme des Urins bei Zimmertemperatur relativ lange stabil waren. So zeigten sie die ersten 7 Tage immer dasselbe Bild, und der pH-Wert war konstant, 5,5. Siehe Abb. 9.

Nach 8 Tagen wurde Arginin, VIII, schwächer, und war nach 9 Tagen nicht mehr darstellbar. Der Fleck trat nie mehr auf. pH: 5,8.

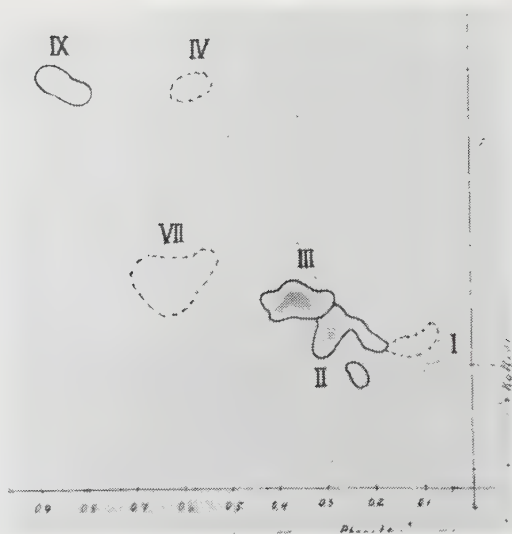


Abb. 10. Nach 13 Tagen bei Zimmertp.

Die folgenden Tage beobachtete man eine deutlich Abschwächung des Tyrosinfleckes, Nr. IV, der aber die ganze Zeit mit orange-violetter Farbe erkennbar war. Der Histidin-Fleck, Nr. VII, wurde ebenfalls bedeutend schwächer. Der als Glutamin beschriebene Fleck, Nr. VI, konnte nach 8 Tagen nicht mehr nachgewiesen werden. Hingegen war der Glykokollfleck, Nr. III, eher stärker geworden. Asparaginsäure, Nr. I, Glutaminsäure, Nr. II, und Phenylalanin, Nr. IX, blieben konstant in ihrer Farbenintensität.

Abb. 10 zeigt das Chromatogramm nach 13 Tagen. Dies ist von besonderem Interesse, weil der pH-Wert bis zum 12. Tag relativ stabil war, 6.0, am 13. Tag stieg er über 8.1, und war somit nach unserer Methode nicht messbar. Diese grosse Veränderung hatte offenbar einen starken Einfluss auf die Asparaginsäure. Der Fleck zeigte von diesem Tag an nicht mehr die frühere charakteristische langgezogene Form, sondern trennte sich in 2 Flecken, die sehr schwach waren, und kaum ersichtlich. — Glykokoll hatte an Intensität zugenommen, während Tyrosin kaum nachweisbar war. Histidin und Alanin waren nicht mehr zu trennen, Fleck Nr. VII.

Dasselbe Bild bestand am Versuchsende, am 20. Tag.

Um Schwefelhaltige Aminosäuren nachzuweisen wurden stän-

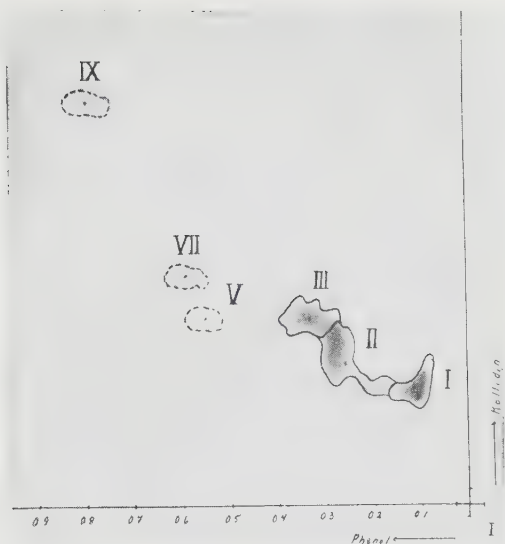


Abb. 11. Nach 4 Tagen bei 37 Grad.

dig Kontrollen mit oxydiertem Urin gemacht. Es konnten aber nach Behandlung mit Wasserstoffperoxyd keine neuen Flecken entdeckt werden.

b) Die Chromatogramme des Urins bei 37 Gr. C.

Das Verschwinden der Flecken und die Veränderung des Musters traten in derselben Weise auf wie in den oben beschriebenen Chromatogrammen. Doch war hier, wie in der ersten Serie, das Tempo und die Intensität der Veränderungen eine entsprechend viel stärkere. — Der Urin zeigte schnell basische pH-Werte.

Nach 3 Tagen war der Argininfleck verschwunden, pH: 6,3. Nach 4 Tagen ebenfalls der Tyrosinfleck, pH: 6,6. Histidin wurde etwas abgeschwächt, Nr. VII. Asparaginsäure, Nr. I, Glutaminsäure, Nr. II, und Phenylalanin, Nr. IX, blieben dagegen konstant in ihrer Farbenintensität. Alle Rf-Werte stimmten gut überein. Auffallend war vor allem die ganz beträchtliche Zunahme der Farbenintensität des Glykokollfleckes, Nr. III. Siehe Abb. 11.

Da der Fleck Nr. III sowohl im Urin bei Zimmertemperatur als auch in diesem Urin ganz deutlich zugenommen hatte, muss-

ten eingehende Untersuchungen zur genauen Identifizierung der Substanz gemacht werden. — Der Glykokollfleck war von Anfang an schwach vorhanden. Wir mussten aber abklären ob es sich um dieselbe Substanz handle, die eventuell aus irgend einem Grunde zugenommen habe, oder ob etwas ganz Neues entstanden sei. In letzterem Falle käme Asparagin oder Polypeptid in Frage. Asparagin hat eine ähnliche Lokalisation wie Glykokoll, und sie decken einander, wenn beide vorhanden sind. Während Glykokoll orange-violette Farbe besitzt, ist der Asparaginfleck mehr braun. Die Polypeptide sind meistens violett. Der Fleck in unseren Chromatogrammen war orange-violett.

Um diese Frage zu lösen, wurden erstens mehrere Chromatogramme ausgeführt, indem einerseits eine Lösung von Glykokoll zum Urin gesetzt wurde, anderseits eine solche von Asparagin. Es zeigte sich dann, dass das zugesetzte Glykokoll in Farbe und Position ganz mit unserem Fleck zusammenfiel. Hingegen war deutlich, dass die Farbe des Asparagins nicht diejenige des Fleckes war. Obwohl die beiden Flecken sich zum grössten Teil deckten, konnten wir wegen des etwas kleineren Kollidinwertes des Asparagins seine braune Farbe ein wenig unterhalb des Fleckes feststellen. Die Tatsache wurde durch wiederholte Chromatogramme bestätigt.

Zweitens wurde auf Polypeptid untersucht, indem der Urin mit konz. HCl pur. hydrolysiert wurde. Ein eventuelles Polypeptid würde durch die Hydrolyse aufgespalten werden und der Fleck verschwinden, während die Bestandteile des Peptides irgendwo anders im Chromatogramm sich zeigen würden. — Nach der Hydrolyse war unser Fleck immer noch in gleicher Position vorhanden, und es traten keine neue Flecken auf. — Wir schliessten aus diesen Untersuchungen, dass der Fleck wirklich Glykokoll war.

Nach 8 Tagen war der pH-Wert 8,1, und mit dem Indikatorpapier nicht weiter messbar. Die Chromatogramme blieben bis dahin und die nächsten Tage ohne Veränderungen. Glykokoll, Nr. III. trat noch stärker mit deutlich orange-violetter Farbe auf. Arginin und Tyrosin blieben konstant weg.

Von dem 14. Tag an beobachten wir eine Schwächung der Asparaginsäure. Doch trat der Fleck nicht so schwach auf wie in den letzten Chromatogrammen des Urins bei Zimmertemperatur. Histidin und Alanin waren sehr schwach, angedeutet durch einen diffusen Fleck. Nr. VII. Glutaminsäure und Phenylalanin blieben unverändert, während Glykokoll ganz stark hervortrat. Siehe Abb. 12.

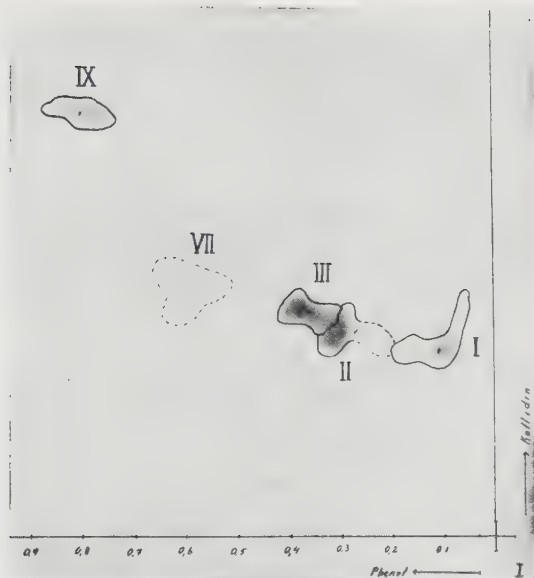


Abb. 12. Nach 15 Tagen bei 37 Grad.

Dies war auch das Bild nach 20 Tagen. Es konnten keine neuentstandenen schwefelhaltigen Aminosäuren nachgewiesen werden nach entsprechender Behandlung des Urins.

In dem Chromatogramm des Urins im Eisschrank nach 20 Tagen war eine Abschwächung des Argininflecks bemerkbar. Sonst blieben die Chromatogramme dieses Urins durch die Versuchs-Dauer gleich.

Die zweite Serie zeigte wieder dieselbe Entwicklung der beiden zersetzten Urinportionen. Es verschwanden dieselben Flecken. Nur ging es viel rascher beim Urin im Brutschrank. — Bei letzterem waren nach 4 Tagen 2 Aminosäuren vollständig verschwunden, nämlich Arginin und Tyrosin, während der Urin bei Zimmertemperatur noch deutlich alle Flecken unverändert aufwies. Erst nach 9 Tagen verschwand hier Arginin, während Tyrosin ganz schwach bis zum Versuchsende nachweisbar blieb. In beiden Urinen nahm Asparaginsäure ab, besonders aber beim Urin im Zimmer. Dies wird in Zusammenhang gesetzt mit der plötzlichen Veränderung des pH-Wertes vom 12. auf den 13. Tag.

Glutaminsäure und Phenylalanin blieben in beiden Urinen stabil, während eine beträchtliche Zunahme des Glykokolls in

beiden feststellbar war, besonders bei dem Urin im Brutschrank. (Vergleiche Abb. 12 und Abb. 8, Fleck Nr. III.)

Serie II zeigt im Vergleich mit Serie I raschere und grössere Veränderungen der Chromatogramme.

Die mikroskopische Sedimentuntersuchung zeigte wie in der ersten Serie Harnsäurekristalle, besonders harnsaures Ammonium in Stechapfelform, Tripelphosphat in Sargdeckelkristallen

Tabell 2. Schematische Darstellung der pH-Werte und der Veränderung des Fleckenmusters bei den bei Zimmertemperatur und bei 37 Gr. C. aufbewahrten Urinportionen. Serie II.

Tage		0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20
Kühlschr.		5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5
pH	Zim.temp.	5.5	5.5	5.5	5.5	5.7	5.8	6.0	8.1	8.1	8.1	8.1
	37°	5.5	5.8	6.6	7.2	8.1	8.1	8.1	8.1	8.1	8.1	8.1
Asparagin- säure	Ztp.	+	+	+	+	+	+	+	(+)	(+)	(+)	(+)
	37°	+	+	+	+	+	+	+	(+)	(+)	(+)	(+)
Glutamin- säure	Ztp.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	37°	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glykokoll	Ztp.	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	+	+	+	+
	37°	(+)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Arginin	Ztp.	+	+	+	+	(+)	÷	÷	÷	÷	÷	÷
	37°	+	+	÷	÷	÷	÷	÷	÷	÷	÷	÷
Histidin	Ztp.	+	+	+	+	+	+	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
	37°	+	+	+	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Thyrosin	Ztp.	+	+	+	+	+	+	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
	37°	+	+	÷	÷	÷	÷	÷	÷	÷	÷	÷
Phenyl- alanin	Ztp.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	37°	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+ = Fleck gut nachweisbar. (+) = Fleck abgeschwächt.

÷ = Fleck verschwunden. ++ = Fleck verstärkt.

(Magnesium-Ammoniumphosphat), und Oxalate. Was hier aber vor allem ins Auge trat, war die grosse Menge von Tyrosinkristallen in typischer Büschelform. Sie waren im Sediment des Urins bei 37 Gr. bedeutend reichlicher vorhanden als es im Sediment des Urins bei Zimmertemperatur der Fall war. Aus dieser Tatsache darf man schliessen, dass wenigstens ein Teil von dieser Aminosäure durch Kristallisation ausfällt und dadurch sich dem chromatographischen Nachweis entzieht. Das stimmt damit überein, dass Tyrosin im Urin bei Zimmertemperatur, dessen Sediment deutlich weniger Kristalle zeigte, noch nachweisbar war.

Die bakteriologische Untersuchung ergab wie in der ersten Serie Colibacillen.

V. Diskussion.

Die beschriebenen Untersuchungen zeigen, dass recht beträchtliche Veränderungen der Chromatogramme bei zersetzten Urinen auftreten, wenn diese Aminosäuren enthalten.

Die Aminosäuren werden wahrscheinlich durch die Bakterienwirkung irgendwie beeinflusst und abgebaut. Wie sich dieser Abbau vollzieht, etwa durch dehydrierende Desaminierung, Hydrolyse, Decarboxylierung oder in anderer Weise kann man nicht sagen und fällt ausser dem Rahmen dieser Arbeit. Es sei nur hingewiesen auf die Beschreibung der Decarboxylierung vieler Aminosäuren unter dem Einfluss der Bakterienflora, zum Beispiel im Darmkanal, so u. a. von Tyrosin und Histidin.

Für den Fall Arginin wäre vielleicht auch an eine Arginasewirkung zu denken, doch konnten wir nie in den Chromatogrammen Ornithin oder Zitrullin nachweisen.

Von Tyrosin ist jedenfalls sichergestellt, dass der Ausfall, beziehungsweise die Abschwächung des Fleckes, zu einem grossen Teil auf Kristallisation beruht, (Sedimentuntersuchung).

Glykokoll, dass in der Serie II nicht zugesetzt wurde, sondern normal im Urin in ganz kleiner, kaum nachweisbarer Menge vorkommt, nahm stark zu. Besonders deutlich war der Fleck bei dem stark zersetzten Urin. Es wurde durch zahlreiche Versuche bestätigt, dass es sich wirklich um Glykokoll handelte, nicht etwa um Asparagin, dass eine ähnliche Lokalisation besitzt, oder um ein Polypeptid. — Sehr interessant ist, dass wir in der ersten Serie keine Verstärkung des Glykokollfleckes bemerken konnten.

Hier war Glykokoll zusammen mit ganz anderen Aminosäuren vorhanden. Der Fleck trat in allen Chromatogrammen mit der gleichen Intensität auf.

Die mit Thymol konservierten Urine, im Eisschrank aufbewahrt, blieben praktisch unverändert während der Versuchsdauer. Doch war der Argininfleck nach 20 Tagen in der zweiten Serie deutlich abgeschwächt. Der pH-Wert dieser Urinportionen war immer konstant. — Im Gegensatz zu dieser Beobachtung berichten *van Slyke, Mc. Fayden und Hamilton*, dass sie keinen Verlust der Aminosäuren nach 5 Monaten fanden, wenn die Urine im Eisschrank bei 4 Gr. C aufbewahrt wurden und mit Thymol konserviert waren. Doch wird nicht genauer angegeben um welche Aminosäuren es sich hier handelt. Ausserdem wurde nicht die Papierchromatographie bei den Untersuchungen verwendet, sondern die Ninhydrin-CO₂-Methode. (*Van Slyke, Mc. Fayden und Hamilton 1943*).

Jedenfalls zeigen die Experimente, wie wichtig es bei der papierchromatographischen Untersuchung von Urinen ist, dass diese frisch sind. Wenn die Untersuchung aus praktischen Gründen sich erst später durchführen lässt, muss eine richtige Konservierung vorgenommen werden. Im letzteren Falle sollte man den Urin sofort auf seinen pH prüfen. Vor der Untersuchung muss man wieder den pH prüfen, und die gefundenen Werte vergleichen. Zeigt der Wert bedeutende Veränderungen, kann das Resultat der Untersuchung nicht als zuverlässig bezeichnet werden.

VI. Zusammenfassung.

Es wurde im zersetzten Urin das Verhalten der folgenden 12 Aminosäuren mittels Papierchromatographie durch etwa 110 Chromatogramme geprüft:

Serin	Asparaginsäure
Glykokoll	Glutaminsäure
Threonin	Histidin
Alanin	Arginin
Tryptophan	Tyrosin
Leucin	Phenylalanin

Die Aminosäuren wurden in Mengen von 50 mg zu 100 cc. frischem Normalurin zugesetzt. (Im normalen Urin können ausserdem Glykokoll, Alanin, sowie Taurin und Glutamin in ganz kleinen Mengen vorkommen).

Der Urin wurde in 3 Portionen geteilt, die 1) bei Zimmertemperatur, 2) bei 37 Grad C im Brutschrank und 3) im Eis-

schränk mit Thymol konserviert, während 20 Tage aufbewahrt wurden. — Es wurden eindimensionale und zweidimensionale Chromatogramme ausgeführt. Als Lösungsmittel wurden Phenol und Kollidin (2, 4, 6-Trimethylpyridin) benutzt. Die pH-Werte wurden mit Indikatorpapier ständig geprüft.

Die Chromatogramme zeigten bei den unter den in 1) und 2) angegebenen Bedingungen aufbewahrten Urinen bedeutende Veränderungen im folgenden Sinne:

- | | |
|------------------|---|
| 1) Serin. | Zimmertp.: Fleck nach 20 Tagen unverändert.
37 G.: Fleck nach 14 Tagen verschwunden. |
|------------------|---|

2)

- a) **Glykokoll** zugesetzt, zusammen mit den 5 ersten Aminosäuren (s. oben):

Zimmertp.: Fleck nach 20 Tagen unverändert.
37 Gr.: Fleck nach 20 Tagen unverändert.

- b) **Glykokoll** normal vorkommend, zusammen mit den 6 letzten Aminosäuren (s. oben):

Zimmertp.: Nach 18 Tagen stark zugenommen.
37 G.: Nach 6 Tagen stark zugenommen.

- | | |
|---------------------|---|
| 3) Threonin. | Zimmertp.: Nach 19 Tagen Fleck verschwunden.
37 G.: Nach 8 Tagen Fleck verschwunden. |
|---------------------|---|

- | | |
|-------------------|--|
| 4) Alanin. | Zimmertp.: Nach 20 Tagen Fleck unverändert.
37 G.: Nach 20 Tagen Fleck unverändert. |
|-------------------|--|

- | | |
|-----------------------|--|
| 5) Tryptophan. | Zimmertp.: Nach 20 Tagen Fleck unverändert.
37 G.: Nach 8 Tagen Fleck abgeschwächt. |
|-----------------------|--|

- | | |
|-------------------|--|
| 6) Leucin. | Zimmertp.: Nach 20 Tagen Fleck unverändert.
37 G.: Nach 20 Tagen Fleck unverändert. |
|-------------------|--|

- | | |
|---------------------------|--|
| 7) Asparaginsäure. | Zimmertp.: Nach 13 Tagen Fleck abgeschwächt.
37 G.: Nach 14 Tagen Fleck abgeschwächt. |
|---------------------------|--|

- | | |
|--------------------------|--|
| 8) Glutaminsäure. | Zimmertp.: Nach 20 Tagen Fleck unverändert.
37 G.: Nach 20 Tagen Fleck unverändert. |
|--------------------------|--|

- | | |
|--------------------|--|
| 9) Arginin. | Zimmertp.: Nach 9 Tagen Fleck verschwunden.
37 G.: Nach 3 Tagen Fleck verschwunden. |
|--------------------|--|

- | | |
|----------------------|---|
| 10) Histidin. | Zimmertp.: Nach 12 Tagen Fleck abgeschwächt.
37 G.: Nach 6 Tagen Fleck abgeschwächt. |
|----------------------|---|

- | | |
|---------------------|---|
| 11) Tyrosin. | Zimmertp.: Nach 12 Tagen Fleck abgeschwächt.
37 G.: Nach 4 Tagen Fleck verschwunden. |
|---------------------|---|

- | | |
|--------------------------|--|
| 12) Phenylalanin. | Zimmertp.: Nach 20 Tagen Fleck unverändert.
37 G.: Nach 20 Tagen Fleck unverändert. |
|--------------------------|--|

Die Chromatogramme der während 20 Tagen im Eisschränk aufbewahrten und mit Tymol konservierten Urinportionen zeigten keine Veränderung ausser einer Abschwächung des Argininfleckes.

Literatur.

- Consden R., Gordon A. H., Martin A. J. P. (1944).
Biochem. J.: B. 38, S. 224.
- Consden R., Gordon A. H., Martin A. J. P. (1946 a).
Biochem. J.: B. 40, S. 33.
- Dent C. E. (1946). Lancet: B. 2, S. 637.
- Dent C. E. (1947). Biochem. J.: B. 43, S. 169.
- Fanconi G. und Bickel H. (1949). Helv. Paed. Acta: B. 4, S. 359.
- Hermann F., Bickel H., Fanconi G. (1949). Helv. Paed. Acta: B. 4, S. 397.
- Ross C. A. C. (1951). Lancet: B. 11 Nr. 5.
- Van Slyke D. D., Mc. Fayden D. A. und Hamilton P. B. (1943).
Journ. Biol. Chem. (N. Y.): B. 150, S. 231.

Ich richte einen herzlichen Dank an Herrn Professor Fanconi, Direktor der Universitäts-Kinderklinik Zürich. An Herrn Professor Leuthardt, Direktor des Physiologisch-Chemischen Institutes der Universität Zürich. Weiter danke ich dem Cheflaboranten des chemischen Labors, Herrn Fritz Hermann, sowie dem Photographen des Kinderspitals, Herrn Staub. — Auch an dieser Stelle einen Dank an meine liebe Frau für wertvolle Mitarbeit.

CURRICULUM VITAE.

Ich — Karl Johan Kristiansen, norwegischer Staatsangehöriger — bin geboren in Oslo, Norwegen am 16.10. 1920. Besuchte Volksschule, Mittelschule und Gymnasium, mit Abitur am Kongsberg Gymnasium, Norwegen im Jahr 1941. Ich studierte an der Universität Oslo bis 1943 Philosophie, Chemie und Physik. Und fing das Medizinstudium an an der Universität Innsbruck, wo ich studierte bis Sommer 1944. Wegen Erkrankung musste ich das Studium längere Zeit aussetzen, und konnte erst im Jahr 1948 das-selbe wieder aufnehmen. So studierte ich seit diesem Jahr an der Universität Zürich.